

VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG VON LUMINESZIERENDEN MOLEKÜLEN NACH  
DER METHODE DER FLUORESCENZKORRELATIONSSEKTROSKOPIE

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere FCS-Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopieverfahren, welches  
5 folgende Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Probe umfassend lumineszierende Moleküle,
- 10 b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungseinrichtung umfassend wenigstens eine Bestrahlungseinrichtung zur Erzeugung von multiplen Strahlen und eine Fokussieroptik zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente,
- 15 c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen mittels einer ortsauflösenden Sensormatrixanordnung und
- 20 d) Verarbeiten der von der Sensormatrixanordnung bereitgestellten Signale mittels einer Signalverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung.

Die Erfindung bezieht sich ebenso auf eine Vorrichtung zur Durchführung  
25 des Verfahrens. Ein Verfahren und eine Vorrichtung der vorstehend genannten Art sind aus der WO 02/097406 bekannt.

Die Verfahren und Vorrichtungen nach der WO 02/097406 ermöglichen auf einfache Weise eine parallele Bestimmung von lumineszierenden Molekülen

- 2 -

in multiplen konfokalen Volumenelementen durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie. Als optische Detektionseinrichtung dient eine ortsauflösende Detektionsmatrix, z.B. zusammengestellt aus einzelnen Avalanche-Fotodioden.

5

Zum Stand der Technik wird ferner auf die EP 0679251 B1 verwiesen. In der EP 0679251 B1 sind Grundlagen der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) dargelegt, von denen auch bei den Verfahren nach der WO 02/097406 A1 und der vorliegenden Anmeldung Gebrauch gemacht wird.

10 Der Offenbarungsgehalt der EP 0679251 B1 und der WO 02/097406 A1 werden insoweit auch zum Inhalt der vorliegenden Anmeldung gemacht. Mittels der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie werden stoffspezifische Parameter bestimmt, die durch Lumineszenzmessung an den Analytmolekülen ermittelt werden. Bei diesen Parametern kann es sich z. B. um Translations-

15 diffusions-Koeffizienten, Rotationsdiffusions-Koeffizienten, die Emissionswellenlänge oder/und die Lebensdauern eines angeregten Zustandes eines lumineszierenden Moleküls oder die Kombination von einer oder mehrerer dieser Messgrößen handeln. Insbesondere kann die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie zur Untersuchung chemischer und fotophysikalischer

20 dynamischer Eigenschaften von Einzelmolekülen genutzt werden (vgl. Rigler, R.; Elson, E. S.; "Fluorescence Correlation Spectroscopy, Theory and Applications; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York, 2001).

25

In einer Standardanwendung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie werden die Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenzsignale der durch Licht angeregten Moleküle gemessen und eine Autokorrelation dieses Signals vorgenommen. Ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird erreicht, indem das konfokale Detektionsvolumen im Bereich einer Lochblende vorgesehen ist, wobei das konfokale Detektionsvolumen extrem klein sein

30 kann und z.B. im Femtoliterbereich und darunter liegen kann.

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie kann z.B. verwendet werden, um molekulare Wechselwirkungen, Strukturänderungen, chemische Reaktionen,

Bindungen an Zellmembranen, fotophysikalische dynamische Eigenschaften und Transport- bzw. Strömungseigenschaften von Molekülen bzw. Proben zu analysieren.

5 Ein Anwendungsbereich für die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist die sogenannte Biochip-Mikroarray-Analyse. Biochips sind in unterschiedlichen Varianten betreffend die Anzahl an Messplatzpunkten verfügbar. So sind Biochips mit einigen wenigen Messplatzpunkten erhältlich, aber auch Biochips, bei denen bis zu 100 000 Messplatzpunkte vorgesehen sind. Die  
10 Messzeit zum Untersuchen bzw. Scannen eines Biochip-Mikroarrays mit konfokaler Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist direkt proportional zur Anzahl der Messpunkte und kann einige Stunden betragen. Die Verwendung von CCD-Kameras mit einigen Tausend Detektorelementen kann das Zeitproblem der parallelen FCS-Detektion von Einzelmolekülen nicht lösen, da  
15 CCD-basierte Systeme eine vergleichsweise lange Auslesezeit für die Messergebnisse benötigen und daher dynamische Echtzeitmessungen (1 ns - 1 ms) nicht ohne weiteres ermöglichen. Es besteht somit Bedarf nach einer Parallel-(Multiplex)-Messmethode mit schnell reagierenden, also quasi-Echtzeit-fähigen, wenig Platz beanspruchenden und vergleichsweise preiswerten Detektoreinrichtungen.  
20

Ausgehend von einem Stand der Technik gemäß der WO 02/097406 liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, die Möglichkeit der Quasi-Paralleldetektion von Lumineszenzereignissen aus mehreren konfokalen Volumenelementen zu verbessern.  
25

Hierzu wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, als Sensormatrixanordnung eine in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie oder BICMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden zum Auf-  
30 fangen der Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen zu verwenden, wobei gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung der Sensorchip bereits Signalverarbeitungs-

- 4 -

und -auswerteschaltkreise integriert enthält. Dies sind insbesondere Schaltkreise zur Berechnung von Korrelationsfunktionen (Autokorrelation oder/und Kreuzkorrelation verschiedener Ordnungen) sowie deren Fouriertransformierte.

5

Der Sensorchip kann eine Vielzahl von Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-Beschaltung aufweisen, so dass bedarfsweise entsprechend viele konfokale Messvolumina parallel detektiert werden können. Aufgrund der IC-Integration, insbesondere CMOS-Integration der lichtempfindlichen Avalanche-Fotodioden kann überdies erreicht werden, dass Exemplarstreuungen der einzelnen Fotodioden innerhalb des Chips vergleichsweise gering sind und somit die einzelnen integrierten Sensorelemente im Wesentlichen gleiche Detektionseigenschaften aufweisen. Testmessungen haben ergeben, dass ein Beispiel eines CMOS-Sensorchip der hier betrachteten Art nicht  
10 den von Fotomultipliern her bekannten Effekt von nachlaufenden Pulsen (after pulsing) zeigt, eine sehr kleine Dunkelzählrate von etwa 40 Hz und eine sehr kurze Totzeit von etwa 30 ns hat. Die integrierten Avalanche-Fotodioden haben eine sehr hohe Empfindlichkeit und sprechen bereits auf einzelne Photonen an. Sie erlauben Einzelmolekülnachweise in den einzelnen  
15 betrachteten konfokalen Volumenelementen nach der FCS-Methode.

20

Die Integration von elektronischen Elementen für den Geiger-Modus-Betrieb der Avalanche-Fotodioden sowie von Signalverarbeitungs- und -auswerteschaltkreisen, insbesondere Korrelatoren, erlaubt extrem schnelle  
25 Messungen und einen Quasi -Echtzeit-Mess- und Auswertebetrieb.

25

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es ferner möglich, zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz durchzuführen und somit zeitkorrelierte Spektroskopie (time correlated spectroscopy) zu betreiben.

30

Die Bestrahlungseinrichtung umfasst vorzugsweise wenigstens eine Lichtquelle und wenigstens ein insbesondere diffraktives optisches Element zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen. Alternativ

- 5 -

kommen zur Strahlaufspaltung z. B. reflektive Strahlteiler, z. B. halbdurchlässige Spiegel, in Frage.

5 Die Bestrahlungseinrichtung kann ferner ein Lichtquellenarray, insbesondere Laserarray oder VCSEL-Array umfassen, welches schon originär multiple Strahlen bereitstellt.

10 Das Verfahren kann grundsätzlich nach den in EP 0679251 B1 oder in WO 02/097406 beschriebenen Methoden durchgeführt werden. Dabei erfolgt vorzugsweise die Messung von einem oder wenigen Analytmolekülen in einem Messvolumen, wobei die Konzentration der zu bestimmenden Analytmoleküle vorzugsweise kleiner  $10^{-6}$  Mol/l beträgt und das Messvolumen vorzugsweise kleiner  $10^{-14}$  l ist. Es werden stoffspezifische Parameter bestimmt, die durch Lumineszenzmessung an den Analytmolekülen ermittelt werden. Auf Einzelheiten zu apparativen Details wird auf die Offenbarung in EP 0679251 B1 und WO 02/097406 verwiesen.

20 Insbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren insoweit entsprechend dem Verfahren nach der WO 02/097406 durchgeführt werden, als in bevorzugten Ausgestaltungen des Verfahrens die lumineszierenden Moleküle aus lumineszenzmarkierten Nachweisreagenzien ausgewählt werden, die an einen in der Probe vorhandenen Analyten binden. Auch kann das Verfahren nach der Erfindung die Messung bzw. Bestimmung eines kreuzkorrelierten Signals umfassen, das von einem, mindestens zwei unterschiedliche Lumineszenzmarkierungen enthaltendem Komplex aus Analyt- und Nachweisreagenz(ien) stammt.

30 Die Molekülbestimmung kann die Messung eines von einem lumineszenzmarkierten Nachweisreagens stammenden Signals umfassen, wobei die Lumineszenzintensität oder/und -abklingzeit des Nachweisreagens bei Bindung an den Analyten verschieden von der Lumineszenzintensität oder/und Abklingzeit im nicht gebundenen Zustand ist. Dabei können die Unterschiede der Lumineszenzintensität oder/und -abklingzeit durch

- 6 -

Quench- oder Energietransfervorgänge hervorgerufen werden.

Die Molekülbestimmung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ferner eine Nukleinsäure-Hybridisierung umfassen, wobei eine oder mehrere  
5 lumineszenzmarkierte Sonden an eine Zielnukleinsäure binden.

Die Molekülbestimmung kann eine Protein-Antikörper-Wechselwirkung umfassen, wobei die Antikörper in unterschiedlichen Lichtwellenlängen (Farben) ermitteln können. Die Signale werden dann bei der Signalverarbeitung einer Kreuzkorrelation unterworfen.  
10

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine enzymatische Reaktion umfassen.

15 Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Nukleinsäure-Amplifikation, insbesondere einen Thermocycling-Prozess umfassen.

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Mutationsanalyse bei Nukleinsäuren umfassen.  
20

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Genexpressionsanalyse bei Nukleinsäuren umfassen.

25 Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung die Messung einer temperaturabhängigen Schmelzkurve bei einer Nukleinsäure-Hybridisierung umfassen.

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Partikel-Selektion umfassen.  
30

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Nukleinsäure-Sequenzierung umfassen.

- 7 -

Der verwendete Träger kann gemäß einer Ausführungsform mehrere, insbesondere mindestens zehn und vorzugsweise mindestens 32 separate Behältnisse zur Aufnahme von Proben enthalten.

- 5 Alternativ kann die Probe in einer Mikrokanalstruktur bereitgestellt werden, wobei ein in der Probe vorhandener Analyt in der Mikrokanalstruktur vorzugsweise festgehalten wird.

- 10 Unter einem weiteren Aspekt kann es vorgesehen sein, dass ein in der Probe vorhandener Analyt einer Spaltungsreaktion unterzogen wird, wobei dem Analyten abgespaltene Fragmente bestimmt werden.

- Der in der Probe vorhandene Analyt kann an ein Trägerpartikel, z.B. aus Kunststoff, Glas, Quarz, Metall oder Verbundwerkstoff, gekoppelt sein.

- 15 Ganz allgemein lässt sich das Verfahren nach der Erfindung anwenden, um lumineszierende Moleküle, insbesondere Einzelmoleküle, aus einer einzelnen Probe in den verschiedenen konfokalen Messvolumina - oder aus verschiedenen Proben in den konfokalen Messvolumina zu bestimmen. Die Paralleldetektion der Lumineszenzereignisse in mehreren Detektionsvolumina erlaubt ferner die Bestimmung der örtlichen Flussgeschwindigkeit (Geschwindigkeitsprofil) in einem Mikrokanal.

- 25 Ferner lässt sich das Verfahren zur Bestimmung von Einzelmolekülen in einer Strömung verwenden. Auch können mehrere Messpunkte in einem Probenvolumen durch mehrere Sensorelemente erfasst werden, wodurch die Detektionswahrscheinlichkeit in stark verdünnten Messproben erhöht werden kann.

- 30 Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina umfasst:

- 8 -

- a) eine Trägeranordnung zur Aufnahme einer Probe, die zu bestimmende Moleküle enthält,
- b) eine optische Anregungseinrichtung, welche multiple Lichtstrahlen bereitstellen kann, und insbesondere wenigstens ein diffraktives optisches Element zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen, und eine Fokussieroptik zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente in dem jeweiligen Messvolumen zur Anregung von Lumineszenz in den multiplen konfokalen Volumenelementen aufweist,
- c) eine optische Detektionseinrichtung zum Nachweis von Lumineszenz aus den konfokalen Volumenelementen, wobei die optische Detektionseinrichtung eine ortsauflösende, in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden zum Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen umfasst, und
- d) Signalverarbeitungs- und -auswertemittel zur Verarbeitung der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix bereitgestellten Signale.

Wie schon oben angesprochen, ist es vorteilhaft, wenn die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel in dem Sensorchip integriert sind, um Quasi-Echtzeitmessungen durchführen zu können.

Als integrierte Signalverarbeitungs- und -auswertemittel kommen in Frage, Korrelatoren für Autokorrelationsbestimmungen oder/und ggf. Kreuzkorrelationsbestimmungen. Als Signalverarbeitungs- und -auswertemittel können Schaltkreise zur Durchführung schneller Fourier-Transformationen der Messsignale vorgesehen und in dem Sensorchip integriert sein. Die Korrela-



torschaltkreise können in einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung nach dem "Multiple-Tau- bzw. Multiple- $\tau$ "-Prinzip Korrelationsoperationen ausführen. Zur Multiple-Tau-Technik kann z.B. auf Schätzel, K., "Correlation Techniques in Dynamic Light Scattering", Journal of Applied Physics B, 1987, S. 193-213, Schätzel, K., "New Concepts in Correlator Design", Proc. of the int. Phys. Conference, Ed. E. Hilger, 1985, Ser. 77, S. 175-184, Peters, R., Introduction to the Multiple Tau Correlation Technique, ALV GmbH, 1996, Schätzel, K., Drewel, M., und Stimac, S. "Photon Correlation Measurements at large Lag Times: Improving the Statistical Accuracy", Journal of Modern Optics, Vol. 35, Nr. 4, 1998, S. 711-718, verwiesen werden.

Als Lichtquelle kommt vorzugsweise ein Laser in Betracht. Als diffraktives optisches Element zur Strahlaufspaltung dient vorzugsweise ein dreidimensionales optisches Gitter, das hindurchtretendes Licht beugt und ein vorbestimmtes Beugungsmuster, umfassend multiple optische Foci, erzeugt. Gemäß einer Ausführungsform der Vorrichtung nach der Erfindung hat der Träger mehrere, vorzugsweise mindestens zehn, insbesondere mindestens 100 separate Behältnisse zur Aufnahme von Proben.

Gemäß einer anderen Ausgestaltung kann der Träger eine Mikrokanalstruktur mit einem oder mehreren Kanälen aufweisen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ferner die Verwendung eines CMOS-Sensorchips mit integrierten Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-Beschaltung für eine parallele Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen in multiplen konfokalen Volumenelementen, insbesondere in einem Verfahren der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie.

Die Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels einer Vorrichtung nach der Erfindung.

Fig. 2 zeigt schematisch ein bevorzugtes Beispiel für die Beschaltung eines Avalanche-Fotodiodenpixels in dem Sensorchip.

5 Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung eines weiteren Ausführungsbeispiels einer Vorrichtung nach der Erfindung.

Bei dem in Fig. 1 gezeigten Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung nach der Erfindung ist als Lichtquelle ein mit einer Lichtwellenlänge von 532 nm  
10 emittierender Dioden-gepumpter Festkörperlaser vorgesehen, dessen Laserstrahl von der Strahlaufweitungsoptik 4 mit den optischen Elementen L1 und L2 aufgeweitet wird, so dass er das diffraktive optische Element 7 im Wesentlichen vollständig ausleuchtet. Unter Verwendung des Kollimators 6 mit den optischen Elementen L3 und L4 und des Mikroskopobjektivs 8 wird  
15 der aufgeweitete Laserstrahl in ein Muster multipler Foci aufgespalten und in die Probe (Flüssigkeitstropfen) bei 12 fokussiert. Die durch die fokussierten Teilstrahlen beleuchteten konfokalen Volumenelemente im Probenvolumen sind in der Fig. 1 nicht im Einzelnen dargestellt. Mit 14 ist in Fig. 1 ein dichroitischer Spiegel bezeichnet, welcher das Anregungslicht in das Mikro-  
20 skopobjektiv 8 und somit zur Probe hin reflektiert. Die von den angeregten Molekülen in den konfokalen Volumina ausgehende Fluoreszenzemission wird über dasselbe Objektiv 8 gesammelt, so dass es durch den dichroitischen Spiegel 14 hindurch zu einem Bandpassfilter 16 gelangt. Das Bandpassfilter diskriminiert das Signallicht gegenüber Rayleigh-Streulicht und  
25 Raman-Streulicht. Das Fluoreszenzemissionslicht wird dann durch die Linsengruppe L5 und L6 hindurch auf den Sensorchip 20 geleitet. Der Sensorchip 20 ist ein CMOS-Chip mit einem integrierten Array von Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-Beschaltung. Mit integriert sind elektronische Komponenten zum Betrieb der Avalanche-Fotodioden und zur Signalverarbeitung, z.B. Quench-Widerstände, Transistoren, Korrelatoren und Re-  
30 chenschaltkreise für weitere Signalverarbeitungsoperationen. Der Sensorchip 20 wird von einem Rechner 22 ausgelesen, wobei ggf. externe Auswertekomponenten 24 zwischen dem Rechner 22 und dem Sensorchip 20

zwischengeschaltet sein können.

In dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 1 ist der Probenbereich 12 als Tropfen auf einem Mikroskop-Deckglas 9 dargestellt.

5

Bei der Verwendung der Vorrichtung für die Durchführung eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens kommt als entsprechender Probenträger 9 insbesondere eine Mikroarray-Struktur mit einer größeren Anzahl von separaten Probenbehältnissen, etwa 100 oder mehr separaten Probenbehältnissen, in Frage, die durch Vertiefungen in einer Platte gebildet sind. Wenn die Zahl der Behältnisse innerhalb des Trägers größer als die Anzahl der durch das diffraktive optische Element erzeugten Teilstrahlen ist, kann der Träger in mehreren Schritten gescannt werden. Hierzu kann die Optik oder/und der Träger durch geeignete Maßnahmen für die einzelnen Schritte jeweils neu justiert werden.

15

Für andere Messaufgaben, etwa für die Einzelmolekül-Sequenzierung oder für die Einzelmolekül-Selektion kann ein Träger mit Mikrokanälen für das Probematerial Verwendung finden.

20

Fig. 2 zeigt schematisch und als Beispiel die elektrischen Komponenten eines CMOS-Fotodiodenpixels. Die Anoden aller Avalanche-Fotodioden AD sind mit einer hohen negativen Spannung VOP von z.B. -18.5 V vorgespannt. Der übrige Bereich des CMOS-Chips befindet sich elektrisch auf Potentialen zwischen Masse GND und der Versorgungsspannung VDD von beispielsweise 5 V.

25

Ein Pixel umfasst eine z.B. kreisförmige Avalanche-Fotodiode für Einzelphotonendetektion und einen Löschwiderstand bzw. Quench-Widerstand R von z.B. 270 k $\Omega$ , welcher in Reihe zwischen der Kathode der Avalanche-Fotodiode AD von der Versorgungsspannung VDD liegt. Die Durchbruchspannung der Diode AD beträgt z.B. 21 V. Die Diode AD ist somit mit einem Spannungswert von 2.5 V über der Durchbruchspannung vorgespannt.

30

An jedem Pixelort ist ferner ein einfacher Komparator K auf der Basis eines Standard-Inverters implementiert. Die Gestaltung der Transistoren erlaubt das Setzen der Eingangsschwellwertspannung für das Umschalten auf Ausgabe auf 3 V. Solange keine Ladungsträger in die Multiplikationsregion der Diode AD gelangen, fließt kein Strom in die Fotodiode AD. Wenn ein Photon die Fotodiode AD trifft, wird der Avalanche-Lawineneffekt ausgelöst. Der Avalanche-Strom entlädt simultan die Diodenkapazität (und parasitäre Kapazitäten an dem Punkt A) und induziert einen Spannungsabfall über dem Widerstand R. Die Spannung über die Diode AD wird geringer. Die Spannung am Knotenpunkt A ändert sich von 5 V auf 2,5 V. Der Komparatorausgang wird daher auf VDD geschaltet. Der Avalanche-Strom wird in einigen Nanosekunden passiv gelöscht. Danach startet der Wiederaufladungsprozess mit einer Zeitkonstanten von etwa 30 ns.

Es wurde eine Totzeit von etwa 32 ns für das Sensorelement gemessen. Während des Entladens steigt die Spannung an dem Knotenpunkt A von 2,5 V auf VDD. Der Komparatorausgang wird auf Masse GND geschaltet. Der Ausgang des Komparators K ist mit einem Eingang des bei M gezeigten Multiplexers verbunden, dessen andere Eingänge von anderen Pixelelementen des Sensorarrays belegt sind und der Bestandteil einer einfachen Adressierschaltung ist. Die Multiplexerkomponenten N sind vorzugsweise in den Sensorchip 20 integriert. Anstelle des Quench-Widerstandes R kann in einer alternativen Ausführungsform der Pixel ein im Sättigungsbereich arbeitender Transistor vorgesehen sein.

In einem Ausführungsbeispiel des Sensorchips 20 ist der fotosensitive Bereich einer jeweiligen Avalanche-Fotodiode etwa  $30 \mu\text{m}^2$ . Eine weitere Miniatürisierung ist möglich.

Fig. 3 zeigt in schematischer Darstellung den Aufbau eines weiteren Ausführungsbeispiels einer Vorrichtung nach der Erfindung. Elemente in Fig. 3, die Elementen in Fig. 1 von der Funktion her entsprechen, sind mit korrespon-

- 13 -

dierenden Bezugswerten gekennzeichnet, wobei zur weiteren Differenzierung in Fig. 3 den Bezugswerten die Buchstaben a bzw. b nachgestellt sind.

5 Das Ausführungsbeispiel nach Fig. 3 eignet sich insbesondere zur Kreuzkorrelationsmessung bei Bestrahlung der Probe mit multiplen Strahlen unterschiedlicher Anregungswellenlängen und erlaubt eine bessere Detektionsspezifität von Biomolekülen. Es kann sehr genau mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden, da nur Biomoleküle mit zweifacher Dye-Markierung bei  
10 der Kreuzkorrelationsoperation betrachtet werden.

Bei einer solchen Dual-Color-Kreuzkorrelationsanalyse werden die Dyes im Beispielfall mittels zweier unterschiedlicher Laserwellenlängen angeregt. Auch eine Zweiphotonenanregung ist möglich.

15 Im Beispielfall der Fig. 3 sind als Strahlungsquellen ein erster Laser 2a, z. B. ein Argonlaser, und ein zweiter Laser 2b, z. B. ein Helium-Neon-Laser, vorgesehen. In den optischen Strahlengängen dieser Lichtquellen folgen eine jeweilige Strahlaufweitungsoptik 4a bzw. 4b sowie die Kollimatoren 6a  
20 bzw. 6b mit einem jeweiligen diffraktiven optischen Element 7a, 7b zur Aufspaltung der aufgeweiteten Laserstrahlen in ein jeweiliges Muster multipler Foci 10a, 10b. Die Teilstrahlen werden mittels der Spiegel 14a, 14b zur Probe 12 geleitet, so dass sie in konfokale Volumenelemente im Probenbereich fokussiert werden. Bei 8 ist das betreffende Mikroskopobjektiv  
25 vorgesehen.

Die von den angeregten Molekülen in den konfokalen Volumina ausgehende Emissionsstrahlung wird über das Objektiv 8 gesammelt, so dass es von dem dichroitischen Spiegel 14c durch die Linse L hindurch zu dem Strahlteiler (dichroitischer Spiegel) 14e gelangt. Die von dem Strahlteiler 14e weitergeleiteten Teilstrahlen gelangen durch die Bandpassfilter 16a bzw. 16b  
30 zu den Avalanchedioden-Sensorchips 20a bzw. 20b mit integrierter Auswerteelektronik. Der Steuerungs- und Auswertungsrechner, welcher Informa-

- 14 -

tionen von den Elementen 20a, 20b erhält, ist in Fig. 3 nicht eingezeichnet.

Nachzutragen ist noch, dass die Teilstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen im Probenbereich 12 in betreffenden konfokalen Volumina einander  
5 überlagern können. Zwei verschiedene Dyes, die als Marker an ein und demselben Molekül vorgesehen sind, können dann simultan zweifarbiges Fluoreszenzlicht emittieren, wenn die Moleküle das Messvolumen der einander überlagerten Foci durchqueren. Die betreffenden Signale der verschiedenen Wellenlängen können dann einer Kreuzkorrelation unterzogen wer-  
10 den, um z. B. Informationen über die Anzahl von zweifach markierten Biomolekülen in einem Probenvolumen zu erfassen usw.

### **Ansprüche**

1. Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch  
5 optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere FCS-  
Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie-Verfahren, umfassend die  
Schritte:
  - a) Bereitstellen einer Probe (12) umfassend lumineszierende  
Moleküle,
  - 10 b) Bestrahlen der Probe (12) mit einer optischen Anregungsein-  
richtung (2, 4, 6, 8) umfassend wenigstens eine Bestrahlungsein-  
richtung zur Erzeugung von multiplen Strahlen und eine  
Fokussieroptik (8) zur Fokussierung von hindurchtretenden  
multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente,
  - 15 c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen  
Volumenelementen mittels einer ortsauflösenden Sensormatrix-  
anordnung (20), wobei die Sensormatrixanordnung eine in IC-  
Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte  
und in einem Sensorchip (20) in Geiger-Modus-Beschaltung in-  
20 tegrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden AD ist, und  
d) Verarbeiten der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix bereitge-  
stellten Signale mittels einer vorzugsweise in den Sensorchip  
integrierten Signalverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Be-  
strahlungseinrichtung mit wenigstens einer Lichtquelle und wenigstens  
einem insbesondere diffraktiven optischen Element zur Aufspaltung  
von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen verwendet wird.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 1 zur Durchführung fluoreszenzkorrelations-  
spektroskopischer Untersuchungen an lumineszierenden Molekülen,  
wobei die Signalverarbeitung die Schritte der Autokorrelation oder/und  
der Kreuzkorrelation oder/und der schnellen Fourier-Transformation

- 16 -

(FFT) von Messsignalen bzw. daraus abgeleiteten Informationen umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei Korrelationsschritte verschiedener Korrelationsordnungen zur Signalauswertung durchgeführt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei die Signalverarbeitung Korrelationsschritte nach dem Ein-Bit-Verfahren oder/und Korrelationsschritte nach dem 4X4-Bit-Verfahren umfasst.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Signalverarbeitung Korrelationsschritte nach dem Multi- $\tau$ -Verfahren umfasst.
7. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend:
  - a) eine Trägeranordnung (9) zur Aufnahme einer Probe (12), die zu bestimmende Moleküle enthält,
  - b) eine optische Anregungseinrichtung (2, 4, 6, 8) zur Bereitstellung multipler Lichtstrahlen und insbesondere umfassend wenigstens eine Lichtquelle (2), wenigstens ein passives oder aktives diffraktives optisches Element (7) zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen und eine Fokussieroptik (8) zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente in dem jeweiligen Messvolumen zur Anregung von Lumineszenz in den multiplen konfokalen Volumenelementen,
  - c) eine optische Detektionseinrichtung (20) zum Nachweis von Lumineszenz aus den konfokalen Volumenelementen,



- 17 -

wobei die optische Detektionseinrichtung eine orts-  
auflösende in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-  
Technologie hergestellte und in einem Sensorchip (20) in  
Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus  
Avalanche-Fotodioden AD zum Auffangen von Emissions-  
strahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen  
umfasst, und

d) Signalverarbeitungs- und -auswertemittel zur Verarbeitung  
der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix (20) bereitge-  
stellten Signale.

8. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach  
Anspruch 7, wobei die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel in den  
Sensorchip (20) integriert sind.

9. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach  
Anspruch 7 oder 8, wobei die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel  
wenigstens einen Korrelator, vorzugsweise mehrere Korrelatoren, zur  
Durchführung von Signalkorrelationsoperatoren, insbesondere zur  
Bestimmung der Autokorrelationsfunktionen oder/und Kreuzkorrela-  
tionsfunktionen erster oder/und höherer Korrelationsordnungen von  
Messsignalen, umfasst.

10. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach  
einem der Ansprüche 7 - 9, wobei die Signalverarbeitungs- und  
-auswertemittel Schaltkreise zur Durchführung einer schnellen Fourier-  
Transformation der Messsignale umfassen.

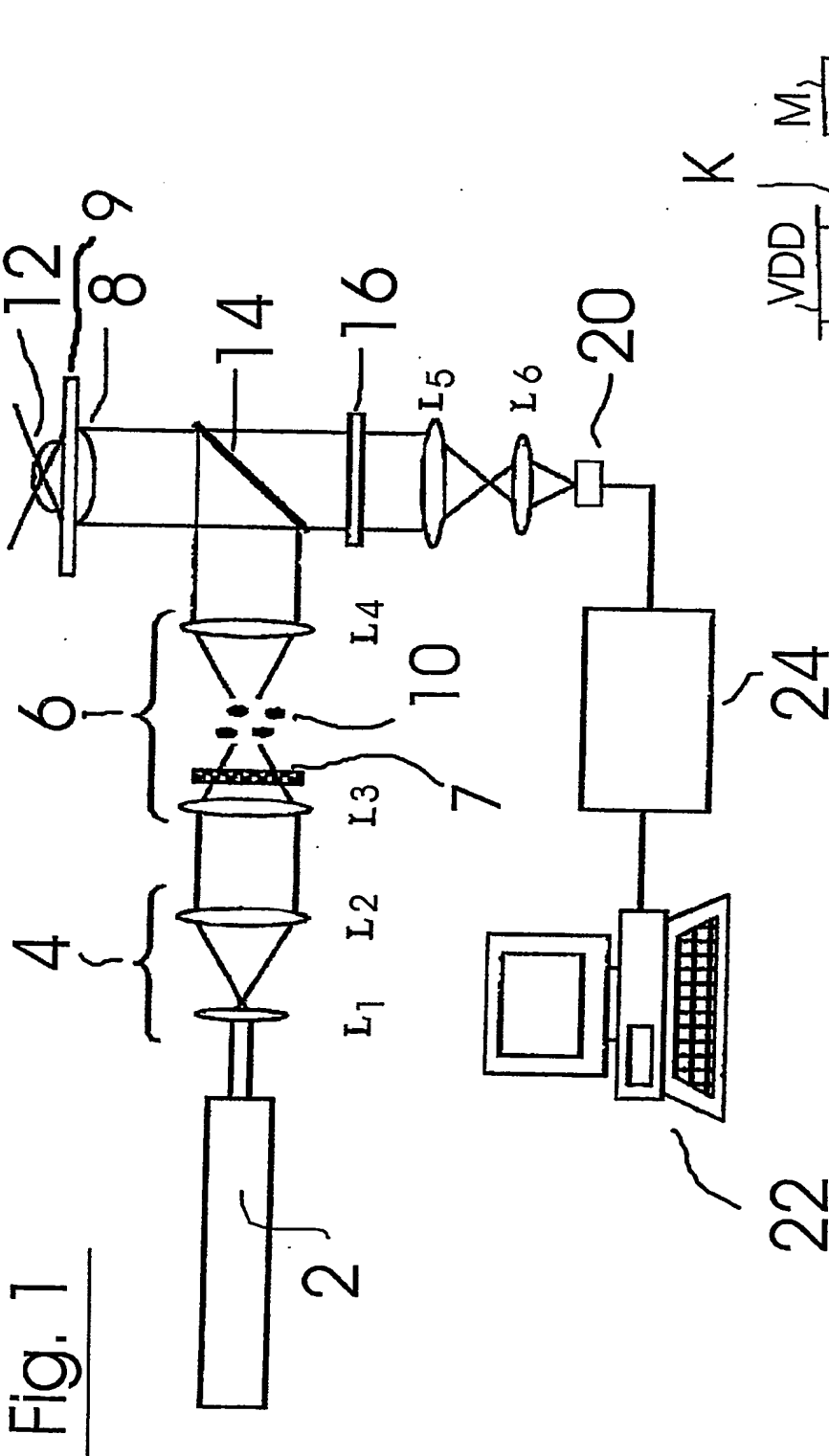


Fig. 1

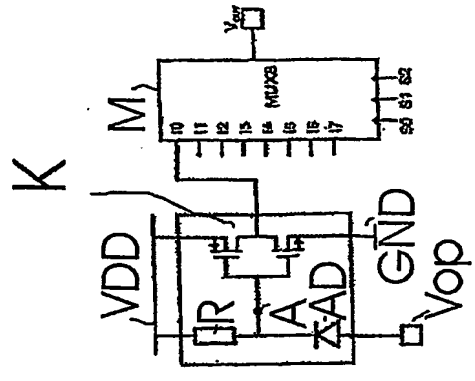


Fig. 2

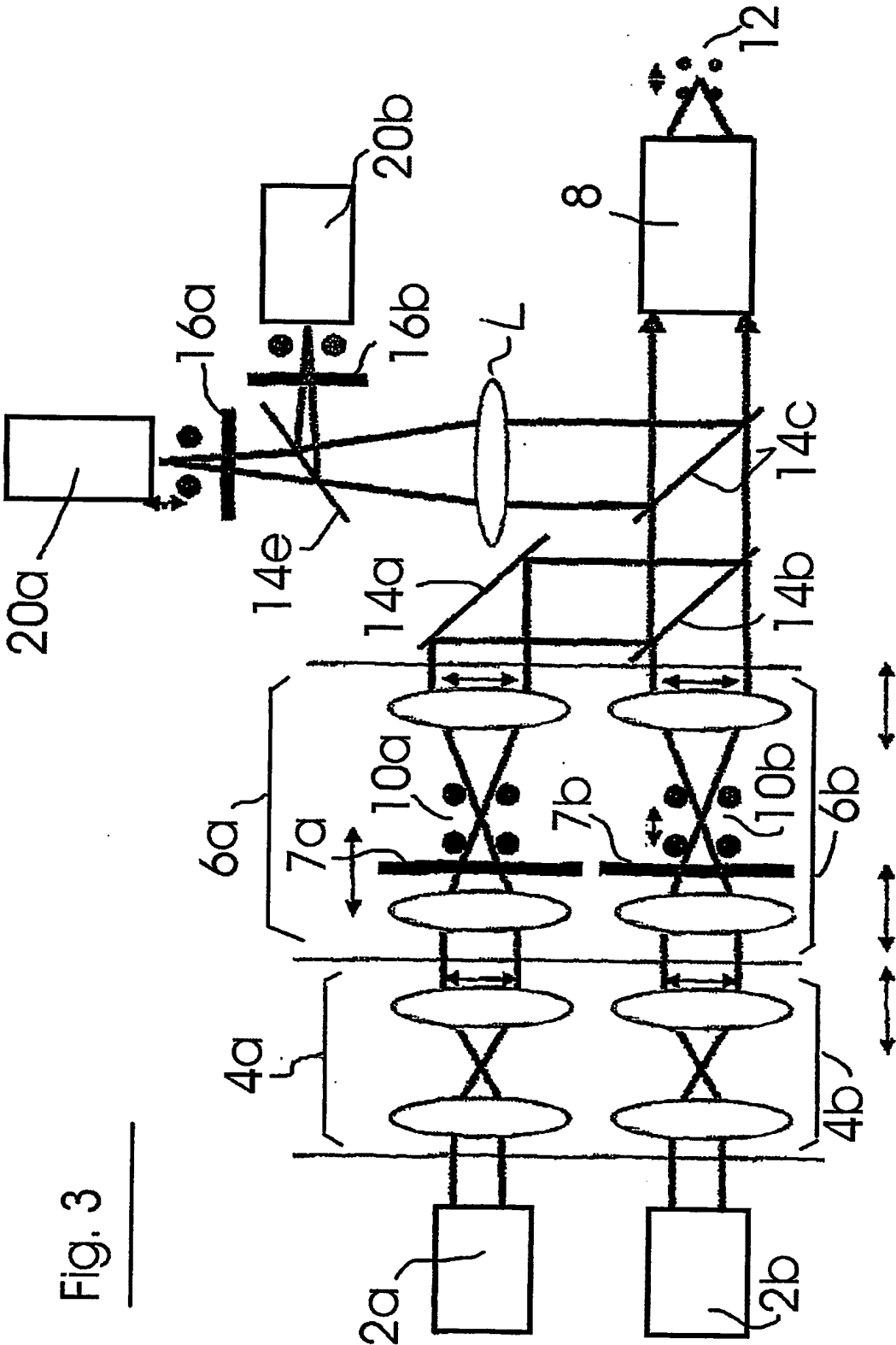


Fig. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008847

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/00 G01N21/64 G06K9/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G02B G01N G06K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROCHAS A ET AL: "FIRST FULLY INTEGRATED 2-D ARRAY OF SINGLE-PHOTON DETECTORS IN STANDARD CMOS TECHNOLOGY" IEEE PHOTONICS TECHNOLOGY LETTERS, IEEE INC. NEW YORK, US, vol. 15, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 963-965, XP001175854 ISSN: 1041-1135 paragraphs '00I.!, '0IV.!	1-10
Y	DE 102 10 737 A (GNOTHIS HOLDING SA ECUBLENS) 20 March 2003 (2003-03-20) paragraphs '0004! - '0011!; claims 1,5,6,28-32 ----- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2004

Date of mailing of the international search report

16/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Consalvo, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP2004/008847

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PHELAN D ET AL: "Geiger mode avalanche photodiodes for microarray systems" PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA, vol. 4626, 2002, pages 89-97, XP002308501 ISSN: 0277-786X abstract</p>	1-10
Y	<p>JACKSON J C ET AL: "Toward integrated single-photon-counting microarrays" OPTICAL ENGINEERING SPIE USA, vol. 42, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 112-118, XP002308502 ISSN: 0091-3286 page 112, column 2, line 16 - page 113, column 1, line 7</p>	1-10
A	<p>DILL KILIAN ET AL: "Antigen detection using microelectrode array microchip" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 144, no. 1, 12 October 2001 (2001-10-12), pages 69-78, XP002308503 abstract</p>	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008847

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10210737	A	20-03-2003	DE 10210737 A1	20-03-2003
			WO 03021240 A1	13-03-2003
			EP 1421367 A1	26-05-2004
<hr/>				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/008847

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G02B21/00 G01N21/64 G06K9/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G02B G01N G06K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROCHAS A ET AL: "FIRST FULLY INTEGRATED 2-D ARRAY OF SINGLE-PHOTON DETECTORS IN STANDARD CMOS TECHNOLOGY" IEEE PHOTONICS TECHNOLOGY LETTERS, IEEE INC. NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 7, Juli 2003 (2003-07), Seiten 963-965, XP001175854 ISSN: 1041-1135 Absätze '00I.!, '0IV.!	1-10
Y	DE 102 10 737 A (GNOTHIS HOLDING SA ECUBLENS) 20. März 2003 (2003-03-20) Absätze '0004! - '0011!; Ansprüche 1,5,6,28-32	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Consalvo, D

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008847

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PHELAN D ET AL: "Geiger mode avalanche photodiodes for microarray systems"            PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA, Bd. 4626, 2002, Seiten 89-97, XP002308501            ISSN: 0277-786X            Zusammenfassung</p>	1-10
Y	<p>JACKSON J C ET AL: "Toward integrated single-photon-counting microarrays"            OPTICAL ENGINEERING SPIE USA, Bd. 42, Nr. 1, Januar 2003 (2003-01), Seiten 112-118, XP002308502            ISSN: 0091-3286            Seite 112, Spalte 2, Zeile 16 - Seite 113, Spalte 1, Zeile 7</p>	1-10
A	<p>DILL KILIAN ET AL: "Antigen detection using microelectrode array microchip"            ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 144, Nr. 1, 12. Oktober 2001 (2001-10-12), Seiten 69-78, XP002308503            Zusammenfassung</p>	1-10



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008847

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10210737      A	20-03-2003	DE      10210737 A1	20-03-2003
		WO      03021240 A1	13-03-2003
		EP      1421367 A1	26-05-2004
<hr/>			

PCT/EP2004/008847  
Copy